

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Seroprevalencia de los virus: Parainfluenza 3,
respiratorio sincitial, diarrea viral bovina, en un
rebaño mixto de una comunidad campesina de la
provincia de Calca, Cusco**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTORA

Karina Olinda Cabellos Rojas

Lima – Perú

2006

A Dios:
Por acompañarme en mi camino.

A mis padres:
Quienes siempre me apoyaron y alentaron para
superarme cada día y lograr mi meta trazada.

A la Dra. Hermelinda Rivera: por su paciencia, ayuda y
aportes realizados a lo largo de la elaboración del presente
trabajo.

Al Dr. Raúl Rosadio y Dra. Jane Wheler: por sus ánimos y apoyo constante. Gracias.

A CONOPA por la oportunidad, especialmente a mis compañeros y amigos: Rocío, Hugo, Katty, Josmel, Juan y Alvaro por el apoyo brindado en el trabajo de campo y su amistad.

De manera muy especial quiero agradecer a la comunidad de Chahuaytiri, especialmente a Nilda Cañañanpa por haberme apoyado en el ingreso a la comunidad, como también a las familias que colaboraron en el trabajo de investigación.

Al laboratorio de Microbiología y Virología y a todo el personal que los componen.

A mis profesores por sus enseñanzas brindadas a lo largo de la formación académica y el habernos inculcado el cariño y orgullo de ser Veterinario.

A mis amigos y compañeros de clases de los que guardo los recuerdos mas bellos de mi época universitaria.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	i
LISTA DE CUADROS.....	ii
RESUMEN.....	iii
SUMMARY.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
A. Características Pecuarias de la Comunidad de Chahuaytiri.....	4
B. Problemas sanitarios de tipo viral.....	6
B.1 Virus Respiratorio Sincitial (VRS)	6
B.2 Virus Parainfluenza Bovina Tipo 3 (PI-3).....	10
B.3 Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB).....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
IV. RESULTADOS.....	25
V. DISCUSIÓN.....	28
VI. CONCLUSIONES	31
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Seroprevalencia de los virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), Virus Respiratorio Sincitial (VRS) y Virus de la Parainfluenza Tipo 3 (PI-3) en rumiantes de crianza mixta, de la comunidad de Chahuaytiri mediante la prueba de neutralización viral. 2003.....	26
Cuadro 2. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina en muestras de suero de rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri, mediante la prueba de neutralización viral. 2003.....	26
Cuadro 3. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el Virus Respiratorio Sincitial en muestras de suero de rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri, mediante la prueba de neutralización viral. 2003.....	27
Cuadro 4. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el virus Parainfluenza 3 en muestras de suero de rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri, mediante la prueba de neutralización viral. 2003.....	27

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia de los agentes neumotrópicos como los virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), Respiratorio Sincitial (VRS) y Parainfluenza 3 (VPI3) en rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri, provincia de Calca, Cusco, a través de la detección de anticuerpos en el suero sanguíneo de alpacas (n=21), bovinos (n=66) y ovinos (n=152) mediante la prueba de neutralización viral (NV). El $15.8 \pm 16.4\%$ (3/21), $4.8 \pm 9.1\%$ (1/21) y el $23.8 \pm 18.2\%$ (5/21) de las alpacas presentaron anticuerpos neutralizantes contra los virus: DVB, RS y PI3. El $90.9 \pm 6.9\%$ (60/66), $87.88 \pm 7.9\%$ (58/66) y el $81.8 \pm 9.3\%$ (54/66) de los bovinos y el $28.29 \pm 7.1\%$ (43/152), $49.34 \pm 7.9\%$ (75/152) y $50.0 \pm 7.9\%$ (76/152) de los ovinos presentaron anticuerpos contra la DVB, RS y PI3, respectivamente. Estos resultados confirman la presencia de infecciones virales en rumiantes bajo sistema de crianza mixto de la comunidad campesina del Cusco.

Palabras claves: Diarrea Viral Bovina, Respiratorio Sincitial, Parainfluenza 3, alpacas, bovinos, ovinos, anticuerpos, neutralización-viral.

SUMMARY

The seroprevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Parainfluenza Virus Type 3 (PI3V) and Respiratory Syncytial Virus (RSV) in serum samples of alpacas (n = 21), bovine (n=66) and sheep (n=152) of a rural community of Cusco, Peru. It was carried out by virus-neutralization test. The $15.8 \pm 16.4\%$ (3/21), $4.8 \pm 9.1\%$ (1/21) and $23.8 \pm 18.2\%$ (5/21) of alpacas had neutralizing antibodies against BVD, RS and PI3 virus. The $90.9 \pm 6.9\%$ (60/66), $87.88 \pm 7.9\%$ (58/66) and $81.8 \pm 9.3\%$ (54/66) of bovine and the $28.29 \pm 7.1\%$ (43/152), $49.34 \pm 7.9\%$ (75/152) and $50.0 \pm 7.9\%$ (76/152) of sheep had antibodies to BVDV, RSV and PI3V respectively. These results confirm the presence of viral infections in ruminants of mixed breeding system of a rural community.

Key words: Bovine Viral Diarrhoea Virus, Respiratory syncytial virus, Parainfluenza Virus type 3, alpaca, bovine, sheep, antibodies, virus-neutralization.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú tiene como legado histórico la mayor concentración de camélidos sudamericanos, criados y manejados por miles de familias campesinas que forman parte de uno de los sectores más pobres del país (Trejo, 2004).

De la población de camélidos en Sudamérica, el Perú tiene el 87% de alpacas (2'719,947), ubicadas en las zonas alto andinas, de ésta población el 9% viene siendo explotada por las empresas alpaqueras empleando mediana tecnología, el 7% por los pequeños y medianos propietarios y el 84% están en manos de comunidades campesinas, bajo crianza mixta con pobre o ninguna tecnología (INEI, 1995).

La población de ovinos se estima en 13.7 millones (INEI, 1995), ubicados por encima de los 3,500 msnm, de los cuales casi el 70% se encuentra en manos de comunidades campesinas. Estos animales son desmejorados, provenientes de las razas españolas introducidas durante la colonización (Rosadio y Ameghino, 1999).

En cuanto a bovinos, el Perú cuenta con una población de 4,5 millones de cabezas, de ellos el 14% corresponde al ganado de raza y el 86% al ganado criollo, el cual se encuentra distribuido mayormente en la sierra, en manos de pequeños y medianos criadores (INEI, 1995).

El rebaño mixto familiar es el sistema de crianza familiar generalizado a nivel de las comunidades alto andinas que le da una característica especial a la crianza de animales domésticos por el productor pastoril, cuya crianza con poco o sin apoyo tecnológico está

conformado por varias especies que incluyen alpacas, llamas, ovinos, vacunos, equinos y porcinos, (Novoa y Flores, 1991). El desarrollo de la ganadería bajo crianza mixta alto andina es muy difícil debido a múltiples factores como la carencia de pastos, deficiencias nutricionales en general así como, las enfermedades parasitarias e infecciosas que ocasionan mortalidad sobre todo en animales jóvenes.

Estudios serológicos realizados en algunas zonas alto andinas han evidenciado la presencia de agentes infecciosos como el virus respiratorio sincitial (VRS), Parainfluenza 3 (PI3), diarrea viral bovina (DVB), bacterias como el *Mycoplasma sp.* y la *Pasteurella sp.*, etc., que probablemente son los causantes de la mortalidad especialmente de animales jóvenes por problemas respiratorios y diarreicos (Ameghino, 1990; Ameghino y De Martini 1991a). Estas pérdidas constituyen un problema socio-económico para los criadores alto andinos que dependen de ellos para su supervivencia (Rosadio y Ameghino, 1999).

No existen estudios serológicos similares en los animales de la comunidad de Chahuaytiri, provincia de Calca en el Cusco, lugar del presente estudio, donde también las pérdidas de los animales jóvenes por problemas respiratorios y diarreicos son frecuentes. Por lo que el presente estudio tuvo por objetivo determinar la seroprevalencia de los agentes neumotrópicos como los virus de la DVB, VPI3, VRS en los animales de esta comunidad.

II. REVISION DE LITERATURA

A.- Características pecuarias de la comunidad de Chahuaytiri.

La comunidad de Chahuaytiri se encuentra ubicada en el distrito de Pisac, provincia de Calca, departamento del Cusco-Perú, con latitud sur de 13° 25' 03" y una longitud oeste de 71° 50' 27", entre altitudes que varían por encima de los 3,300 msnm (Fuente: Inst. Geográfico del Perú).

El entorno productivo de la comunidad se caracteriza generalmente por ser agropecuario; observándose un mayor desarrollo de la actividad ganadera con una población aproximada de 244 alpacas, 2181 ovinos y 92 bovinos (encuesta personal), pastoreados en una extensión total de 279,000 hectáreas, compuesta de 75 familias campesinas que tienen relaciones económicas y socioculturales comunales utilizando la misma área de pastoreo (Fuente: Ministerio de Agricultura).

Se enfatiza que, los sistemas de crianza en la comunidad se caracterizan por tener una composición de policrianza denominada rebaño mixto familiar (alpacas, ovinos, vacunos, caprinos, etc.) de utilidad semi-comercial, pues se trata generalmente de una producción de autoconsumo.

El ecotipo predominante son los animales criollos, tanto en ovinos y vacunos como en camélidos en que se observa la degeneración de las variedades y/o razas, con productividades

generalmente bajas (carne, leche, fibra, etc.), aunque razonables para las condiciones de manejo y alimentación en que se desarrollan.

En casi el total de las familias encuestadas no tienen reproductores mejorados, el calendario de manejo del ganado difiere de una familia a otra, dependiendo del tamaño del hato y la disponibilidad de mano de obra (tamaño de la familia), siendo las condiciones muy precarias en sus animales. Esta crianza y otras actividades se caracterizan por un movimiento constante de animales entre criadores, estancias y aún entre localidades.

El clima es variado durante el año, sin embargo se distinguen claramente dos épocas: la lluviosa (Noviembre-Abril) y seca (Mayo – Octubre) realizándose el pastoreo en las zonas bajas trasladándose a las zonas altas respectivamente de acuerdo a la época; en el día los animales son pastoreados en forma mixta desde las 9 am hasta las 6 pm, en algunos casos el pastoreo conjunto en las mismas canchas, y en otros casos comparten el mismo corral para pernoctar.

El sistema de alimentación del ganado es pastoreo a campo abierto, es decir se alimentan con forrajes provenientes de las pasturas naturales, complementándose con pastos cultivados y rastrojos aunque algunas de las familias estudiadas utilizan además golpes vitamínicos en mínimas cantidades en las épocas de estiaje. Generalmente uno de los problemas latentes en la comunidad es la escasez de biomasa en épocas de sequía.

La salud animal en la comunidad estudiada está representada por las enfermedades que alteran al organismo animal producidas por agentes patógenos, biológicos, mecánicos, físicos o agentes químicos, presentándose fundamentalmente las enfermedades parasitarias e infecciosas. Las enfermedades parasitarias son internas y externas, entre las internas la principal es la distomatosis, en cuanto a las enfermedades parasitarias externas se tiene al *Melophagus ovinus*, casi el 100% de la población ovina padece severamente de esta parasitosis y también de piojos, ácaros causantes de la sarna.

La mayoría de los comuneros manifiestan que las neumonías, diarreas, abortos eran los problemas más frecuentes y que los abortos mayormente ocurren en el primer tercio de gestación de las alpacas.

Los roles que juega el rebaño mixto familiar, dentro de la vida de estas familias están relacionados con los aspectos económico-productivos y socio culturales fundamentalmente y la complementariedad e interdependencia es constante, incluso dentro del rebaño existe cierta especialización en el cumplimiento de sus roles, o sea que la composición del rebaño es mixta debido a varias prácticas como el ahorro en mano de obra, mejor aprovechamiento de las praderas naturales, y las funciones económicas que cumple cada especie entre otros factores.

La función económica está representada fundamentalmente por el capital ganadero con que cuentan, es decir el ganado es su fuente de ahorro y capitalización, para recurrir a él en casos de necesidad o urgencia económica, ya que es un capital fácilmente movable. (Aquino, 1997). Los animales mayores son utilizados para inversiones relativamente grandes (construcción de casa, compra de terreno, etc.). El ganado en la economía campesina también sirve para practicar el trueque en algunas familias pastoras.

Se manifiesta que la ganadería campesina no tiene objetivos netamente productivos, comerciales (económicos), como en el sector moderno, pero en un sistema donde para la ganadería prevalece la función de ahorro, tiende a un número máximo de animales, enfatizando la reproducción sin hacer mayor saca y selección, por lo tanto la diferencia entre lo tradicional campesino y lo moderno no es tan estricta porque los campesinos en algunas especies (alpaca) tienen objetivos económicos y en otras quizá sólo esperan roles sociales, como se comprueba en los estudios de caso, las familias pastoras siempre tienden a obtener utilidades monetarias (Trejo, 2004).

La racionalidad campesina de crianza de sus animales prioriza la provisión de fuente de energía (transporte, combustible), de fertilizantes orgánicos (estiércol), capitalización o ahorro en vivo (animales mayores), abastecimiento de productos de subsistencia (alimentación, vestido), disponibilidad en efectivo (cuasi-dinero) en momentos de emergencia, utilización de mano de obra familiar y uso de recursos marginales. Aquí se nota que están presentes los aspectos económicos, sociales y culturales. Consecuentemente les conviene la crianza del rebaño mixto, porque cada especie cumple un rol fundamental en esta lógica (Aquino, 1997).

La producción de fibra, constituye en la actualidad la principal fuente de ingreso de los criadores, por lo que su problemática incide directamente sobre su economía. (Mansilla, 2004)

como es el caso de los pobladores de esta comunidad quienes se dedican a su comercialización y transformación artesanal.

La producción agrícola es básicamente de subsistencia, salvo en años buenos en que se comercializan los excedentes (mercado interno y externo), la producción y productividad generalmente es baja, es una actividad de poli-cultivo donde las familias campesinas siembran diversas especies vegetales con la finalidad de asegurar la cosecha de por lo menos algunas especies, por los riesgos climáticos y así asegurar su autoconsumo, la agricultura está estrechamente ligada con la ganadería; se practican hasta ahora las rotaciones de lugares o tierras de cultivo.

B.- Problemas sanitarios de tipo viral:

B.1- Virus Respiratorio Sincitial .

El virus respiratorio sincitial (VRS) es un miembro de la familia Paramixoviridae del género Pneumovirus, está implicado en la iniciación de enfermedad respiratoria en bovinos de todas las edades pero principalmente en terneros menores de 6 meses (Karhs, 1981) facilitando el establecimiento de infecciones bacterianas secundarias y es uno de los agentes etiológicos del complejo respiratorio bovino (CRB) (Valarcher *et al.*, 2000).

El VRS del bovino y del humano (VRSH) se agrupan tentativamente con el virus de la neumonía del ratón (PVM). Dentro de este género todas las especies son morfológicamente similares y están antigénicamente relacionados (Olsen *et al.*, 1984).

El primer aislamiento de VRS fue hecho por Paccaud y Jacquier de un brote de enfermedad respiratoria bovina en Suiza en 1970. El virus se nombra así por la propiedad de inducir formación de sincitios o células multinucleadas en las células de animales infectados (Tjernehoj *et al.*, 2002).

El VRS está compuesto de núcleo - cápside y envoltura viral su genoma tiene una sola cadena de ARN pleomórfico, no segmentado y de polaridad negativa, su tamaño varía de 80 a 200 nm (Karhs, 1981). Presenta dos proteínas principales de superficie, la proteína de fusión

F y la glicoproteína G, además una pequeña proteína hidrofóbica SH y la proteína M2, que inducen la producción de la respuesta humoral y celular (Valarcher *et al.*, 2001) (Valentova, 2003).

Al parecer VRS es originario del bovino, pero se ha aislado también en ovinos, cabras, monos, porcinos, caballos, perros y gatos. Produce enfermedad subclínica en cuyes y ratones. El rol que ocupan estas otras especies en la propagación del virus es aún desconocido (Poel *et al.*, 1994).

La ruta natural de transmisión del VRS es por contacto con las secreciones nasales de animales infectados, pudiendo transmitirse también por aerosoles entre grupos de terneros en corrales adyacentes, en establos caracterizados por hacinamiento y deficiente ventilación (Poel *et al.*, 1994).

Las infecciones experimentales producen evidencia que el virus se concentra principalmente en las células individuales del epitelio alveolar, en algunos macrófagos alveolares, y células epiteliales del bronquiolo resultando en bronquiolitis y alveolitis. Se ha demostrado la persistencia de VRS a nivel inferior de la tráquea, bronquios y ganglios linfáticos del mediastino (Kimberling, 1988).

Las lesiones macroscópicas consisten en áreas multifocales de consolidación craneoventral aunadas a zonas multifocales de enfisema intersticial y presencia de exudado mucoso o mucopurulento en zonas afectadas. De igual modo, en las lesiones histológicas se pueden observar algunos cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos, células gigantes o sincitiales, las cuales se deben a la infección viral, el número de macrófagos y neutrófilos en los capilares se ve incrementado, hay migración hacia el lumen del alveolo seguido de hipertrofia y mitosis en neumocitos tipo I y mayormente en neumocito tipo II produciendo fusión, degeneración y necrosis (Bryson *et al.*, 1991).

El curso de la enfermedad varía de 3 a 10 días, una parte del ganado desarrolla la neumonía y un pequeño porcentaje de éste sucumbe. Las bacterias y el estrés causado por movimiento, hacinamiento y los cambios de temperatura, contribuyen a precipitar la infección clínica, el aumento de producción de esteroides que ocurre en el estrés es lo bastante inmunosupresor

para permitir la activación de los virus latentes o infección por virus exógenos (Poel *et al.*, 1994).

Las infecciones pueden ser inaparentes pero frecuentemente están asociadas con enfermedad respiratoria aguda caracterizada por fiebre con temperaturas de 42 ° C en las etapas iniciales, llegando a un máximo a los 5 a 7 días y disminuye después a 40 ° C – 41 ° C (Bryson *et al.*, 1991). Se presenta respiración rápida, descarga nasal y ocular, tos, anorexia, depresión, salivación, disminución de la producción de leche, edema pulmonar severo y enfisema en terneros destetados (Olsen *et al.*, 1984).

Experimentalmente las ovejas son sensibles al VRS, presentan signos clínicos y lesiones pulmonares similares que los bovinos. Estudios epidemiológicos han mostrado que la periodicidad estacional de la infección es usual, se sugiere que el VRS circula en el hato durante la primavera o el verano en un nivel muy bajo a pesar de las constantes infecciones, en otras estaciones las infecciones primarias eran raras, no así los casos de reinfecciones. La infección persistente de VRS en un número considerable de vacas en el hato puede ser un medio para que el virus sobreviva durante el verano, pero un buen porcentaje de reinfecciones de vacas seropositivas a lo largo del año también puede actuar como depósito del virus (Poel *et al.*, 1993).

El bovino infectado produce anticuerpos humorales y conjuntamente con la aparición de estos anticuerpos se reduce la posibilidad de aislamiento viral. VRS induce en el ganado infectado una respuesta específica de inmunoglobulina IgE, ello puede dar lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo 1, ya que existe relación directa entre este valor y la gravedad de la enfermedad que produce (Graham, 1996).

La protección que brindan los anticuerpos maternos se consideran incompletas ya que no reduce la difusión del virus después de la infección, el ternero puede enfermarse clínicamente (Bryson *et al.*, 1991). Reinfecciones en bovinos usualmente ocurren sin inducir signos clínicos lo cual sugiere que una infección natural protege contra los signos clínicos de reinfecciones siguientes (Schrijver, 1996).

Después de una infección natural se producen títulos de anticuerpos elevados contra la proteína G y F contrariamente a lo que ocurre después de una infección experimental que presenta bajos títulos de anticuerpos. Factores importantes contribuyen a la diferente respuesta de anticuerpos después de una infección experimental o natural que incluyen dosis infectiva, ruta de inoculación e indirectamente condiciones climáticas y de alojamiento. La persistencia individual del virus caracterizada por la reactivación y difusión, es más importante en infecciones recurrentes, que la persistencia grupal del VRS porque se va transmitiendo continuamente de los animales agudamente infectados a otros animales susceptibles en el hato (Schrijver, 1996).

Basado en los estudios de serología y aislamiento, este virus es prevalente en las poblaciones ganaderas del mundo y es considerado endémico en estas áreas. En Inglaterra, 83% de bovinos presenta el anticuerpo, estudios previos en USA implican al VRS en más del 50% de enfermedades respiratorias en animales de engorde. En Suiza, un tercio de las muestras de suero probadas eran positivas al anticuerpo y el 67% en Alabama, Francia 30%; Maryland 38%, Oklahoma 76%, Quebec 35%. Así mismo en Checoslovaquia, Bélgica, Japón, África, las Islas británicas y, en el U. S. en Missouri, Iowa, y Nebraska se ha tenido reportes de bovinos positivos a este virus (Tjornehoj *et al.*, 2002).

En un estudio realizado en 9 especies no bovinas que tuvieron contacto con bovinos seropositivos, se obtuvo que más del 50% de los sueros presenta anticuerpos, de éstos el 27.5% correspondían a cabras, 3 caballos positivos, 2 roedores, 1 gato y 1 perro. Lo que indica que solo las cabras podrían jugar un papel en la epidemiología del VRS (Poel *et al.*, 1995).

En ganado lechero de Lima se reportó una seroprevalencia de 56% (Rivera *et al.*, 1987 b). En ovinos de la sierra central se determinó una seroprevalencia de 47.1% (Rosadio *et al.*, 1984). En alpacas de una empresa asociativa del departamento de Puno se determinó 16.6% de seroprevalencia (Rivera *et al.*, 1987 a); mientras que Manchego *et al.*, 1988) en una comunidad de Arequipa reportó 8% de alpacas positivas al VRS y 58% en ovinos. En alpacas adultas de la provincia de Canchis - Cusco se determinó 80.16% (Victorio *et al.*, 2004). En el valle de Lima este virus ha sido reportado con una prevalencia de 41% en terneros con complejo respiratorio bovino (Rivera *et al.*, 1994).

Los signos y lesiones son generales e inadecuadas para los propósitos de diagnóstico, debido a que las lesiones producidas son poco específicas, por consiguiente, el diagnóstico es generalmente realizado en el laboratorio (Karhs, 1981).

B.2- Virus de la Parainfluenza Bovina tipo 3.

El virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (PI3) pertenece al género Paramixovirus de la familia Paramixoviridae, es causa importante de infecciones respiratorias en bovinos y ovinos jóvenes, por lo general afecta animales que oscilan entre las 2 semanas y los 12 meses de edad (Karhs, 1981).

En cultivos celulares, el VPI-3 induce efectos citopáticos (CPE) caracterizados por formación de filamentos citoplasmáticos, espacios intranucleares e inclusiones citoplasmáticas (Olsen *et al.*, 1984).

VPI-3 fue aislado originalmente del ganado con fiebre del embarque y designado como SF-4, también fue llamado myxovirus bovino ya que era asociado con la mucosidad nasal que presentaban los animales infectados (Karhs, 1981), desde entonces el virus ha sido recuperado de animales aparentemente sanos, con signos de enfermedad respiratoria y de fetos abortados (Drunen *et al.*, 1999).

El VPI-3 presenta una cadena ARN negativa no segmentada. Contiene seis polipéptidos, las dos mayores glicoproteínas que están presentes en su superficie son HN (73 KDa) responsable de la hemoaglutinación y actividad neuraminidasa, y la glicoproteína F (51 KDa) responsable de la fusión celular y hemólisis, que posibilita la infección celular por el virus (Drunen *et al.*, 1999). Estas 2 glicoproteínas son necesarias para la formación de sincitios celulares y estimulación de la inmunidad (Hurk *et al.*, 1999).

Posee además las siguientes proteínas: la nucleocápside (NP) que encapsula al ARN viral, la fosfoproteína (P), la polimerasa viral (L) que es multifuncional liga a P y tiene un papel en la transcripción del ARN (Martin y Aitken, 1983), la proteína matriz (M) ésta juega un rol indefinido en el ensamblaje del virión y empaque del ARN (Haller *et al.*, 2000), además posee

3 proteínas más pequeñas (C, D, V) la proteína C inhibe la acción del interferón y la proteína V retarda la progresión del ciclo de la célula (Haller *et al.*, 2001).

El VPI-3 puede infectar a muchas especies, el bovino es probablemente el principal reservorio y usual fuente de infección para otros animales del rebaño, sin embargo, estudios de anticuerpos indican que el humano, perro, oveja, búfalo de agua, ciervo, caballos y monos también pueden ser infectados. En camélidos sudamericanos sólo existen estudios de Seroprevalencia mas no hay reportes de que estos virus causen enfermedad clínica (Mattson, 1994).

Se piensa que la infección por aerosoles y el contacto directo con las secreciones nasales de animales enfermos son las formas de transmisión del VPI-3, y ambos se acentúan en condiciones de hacinamiento y ventilación inadecuada (Drunen *et al.*, 1999).

El VPI-3 puede persistir durante varias semanas, afectando a los macrófagos alveolares al inhibir la fusión de lisosomas y fagosomas, impidiendo los mecanismos de depuración pulmonar, este daño al epitelio crea un ambiente ideal para el establecimiento de invasores bacterianos secundarios como la *Mannhemia haemolytica* que es una de las bacterias patógenas más importantes del tracto respiratorio en los rumiantes domésticos (Fulton *et al.*, 2003). Coincidentemente, cuando los niveles de Ig G1, Ig G2, Ig A son bajas, los casos de neumonías en terneros se ven incrementados y cuando dichos niveles comienzan a elevarse, la incidencia de casos de neumonía declina (Adair *et al.*, 1999).

En casos fatales el VPI-3 puede ser recuperado del pulmón, tráquea, laringe y nódulos linfáticos del tracto respiratorio. Las lesiones macroscópicas consisten en leve rinitis con secreción serosa o mucopurulenta, se observa áreas multifocales de colapso o de consolidación localizados en los lóbulos anteriores de los pulmones región cráneo ventral. De igual modo, en las lesiones histológicas se pueden observar hiperplasia del epitelio broquial y bronquiolar, descamación del epitelio que ocluyen los bronquiolos pequeños y los conductos alveolares, presenta congestión de capilares con edema intersticial y alveolar extendido con la formación de membranas hialinas en los alvéolos y parénquima (Kimberling, 1988).

El curso de la enfermedad varía entre 4 a 12 días, por lo general de curso subclínico. El VPI3 bovino se ha podido aislar de animales de apariencia normal y de fetos abortados (Hurk *et al.*, 1999).

La infección viral puede causar una reacción febril ligera, descarga nasal serosa o mucoserosa, secreción ocular, apatía, anorexia, tos e incremento en la frecuencia respiratoria seguida de expiración forzada, congestión de la mucosa respiratoria (Karhs, 1981).

La mayoría de los animales jóvenes adquieren anticuerpos calostrales contra VPI3 que los protege de infecciones durante los 6 primeros meses de vida. Se ha detectado también epidemias en ovejas adultas mayores de 5 años (Martin y Aitken, 1983). La frecuencia de las infecciones con PI-3 sugiere que la persistencia de las infecciones ocurre o que existe un reservorio común no bovino capaz de esparcir la infección en poblaciones bovinas (Fulton *et al.*, 2003).

La alta prevalencia de anticuerpos entre adultos sugiere frecuente reinfección o prolongada persistencia de títulos de anticuerpos o ambos. La infección fetal probablemente requiere infección primaria durante la gestación, un raro evento en poblaciones con alta prevalencia de anticuerpos (Olsen *et al.*, 1984).

En un estado en Louisiana, USA, se determinó que el 100% de los bovinos y 74.1% de los ovinos fueron positivos al VPI3 (Brako *et al.*, 1982). En otro estudio se encontró que el 87.2% de corderos en un Estado de Norte América seroconvirtieron (Lehmkuhl *et al.*, 1985), mientras que en Québec- Canadá se obtuvo una prevalencia de 26% en ovinos (Lamontagne *et al.*, 1985).

En el Perú, se ha determinado una prevalencia de 45% en ganado de engorde y 21% en ganado lechero del valle de Lima (Rivera *et al.*, 1987 b). En el valle de Lurín se determinó que el 99% de terneros durante un brote de complejo respiratorio fueron positivos al VPI-3 (Rivera *et al.*, 1994). Así mismo, ovinos de la sierra del Perú mostraron 82.3% de prevalencia (Rosadio *et al.*, 1984).

En alpacas de una SAIS de Puno se obtuvo 35.3% de positivos (Rivera *et al.*, 1987 a), mientras que el 66% de alpacas, 63% de ovinos y 30% de llamas fueron positivas en una comunidad de Arequipa (Manchego *et al.*, 1998). En llamas se encontró una prevalencia de 28 a 54% en animales de empresa asociativas y de 27 a 75% en tres comunidades campesinas (Rivera *et al.*, 1990 a) y vicuñas en semicautiverio en el departamento de Puno, fueron negativas (Rivera y Ameghino, 1990).

C.- Virus que afectan el tracto reproductivo:

C.1.- Virus de la Diarrea Viral Bovina.

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un miembro del género Pestivirus, familia *Flaviviridae*. Está estrechamente relacionado con el virus de la peste porcina clásica y el virus de la enfermedad de la frontera (Dereget *et al.*, 2004).

El VDVB es una de las principales causas virales de enfermedades respiratorias y reproductivas bovinas, produce pérdidas económicas significantes a nivel mundial. Estas pérdidas pueden ser principalmente atribuidas a una reducción en la tasa de concepción, incremento en los abortos y problemas sanitarios (Nobiron *et al.*, 2003).

El genoma del VDVB es un ARN de polaridad positiva de cerca de 12.5 kb de longitud. Durante la replicación viral se comporta como un ARN mensajero y directamente es traducido en una poliproteína que se corta durante y post traducción por enzimas proteolíticas de origen viral y celular que constituirán las diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus (Nobiron *et al.*, 2003).

De las proteínas estructurales, la p 14/C, Gp 48/E0, p 75/ NS5B y Gp 53/E2 son las más estudiadas. La p14 constituye el cápside y es el antígeno del grupo viral, las glicoproteínas 48, 75 y 53 están asociadas a la envoltura viral, de éstas la gp 48 y 53 son muy antigénicas e inducen la producción de anticuerpos neutralizantes o protectivos en el hospedero después de infección o vacunación. La gp 53 es la de mayor importancia inmunológica por inducir los anticuerpos neutralizantes constituyendo el antígeno específico de serotipo viral y la proteína susceptible a mutaciones dando lugar a las variantes del virus. Además de las proteínas

estructurales, las proteínas no estructurales p20/Npro, p125/ NS23 y p80/NS3 son también importantes para la biología e inmunología del virus (Sanjuán *et al.*, 1999).

Los estudios de caracterización del genoma han mostrado una extensiva diversidad genética y antigénica entre las cepas tipo I del VDVB. Cepas heterogénicas y diferentes en patogenicidad pueden tener un determinado rol en patogenicidad y resultado clínico de infección inducida por VDVB (Baule *et al.*, 2001).

En base a su capacidad de inducir efecto citopático en cultivos celulares, cepas de VDVB son divididas en biotipo citopático (cp) y biotipo no citopático (ncp). La mayoría de infecciones agudas son causadas por el biotipo ncp, mientras que el biotipo cp es comúnmente aislado, junto con el biotipo ncp, en animales que sufren enfermedad de las mucosas (MD) (Baule *et al.*, 2001).

Olapson, Mc Callum y Fox demostraron por primera vez en 1946 la existencia de una enfermedad contagiosa en bovinos del estado de Nueva York, comprobaron su etiología viral y la denominaron Diarrea Viral. En ese mismo año Childs describió en bovinos de Canadá una enfermedad similar a la Diarrea viral, pero de características más severas, de mortalidad alta, aunque de morbilidad baja. Fernelius en 1971 indicó que ambos virus deben considerarse como uno solo (Barriga, 1997).

La introducción del virus DVB al Perú al parecer fue con la importación de bovinos durante la década de 1960-1970; en 1962-1963 se presentaron en Lima y en el Valle del Mantaro algunos animales crías de vacas importadas con severos cuadros diarreicos. Los estudios anatomopatológicos realizados y el análisis serológico confirmaron el diagnóstico de Diarrea Viral bovina (Rivera, 1993).

Los vacunos son considerados como el principal reservorio y fuente usual de infección, además de éstos, el VDVB ha sido aislado en muchos otros animales, como ovejas, cabras, camellos, rumiantes silvestres y porcinos, por lo que también son considerados potenciales fuentes de infección; aunque la transmisión entre especies ha sido demostrada sólo entre ganado ovino y bovino (entre ambas especies) y entre ovinos y porcinos (Sanjuán *et al.*, 1999).

La transmisión es principalmente directa, a veces puede ser llevado de un hato a otro hato por personal que ha estado en constante contacto con animales enfermos. Se ha demostrado bajo condiciones experimentales que el uso de guantes rectales pueden transmitir la infección a los animales susceptibles después del uso en un animal PI. Es más, la habilidad de moscas hematófagas, agujas hipodérmicas, las nariceras, e incluso el aire del ambiente pueden actuar como vectores para extender el VDVB excretado por los animales PI, considerando que el virus puede persistir en el ambiente durante aproximadamente dos semanas. Algunas veces los frascos de medicina cuya membrana de caucho se contaminó con el agente, una vez abiertas y usadas dentro de un hato infectado, son comúnmente usada en otros hatos (Niskanen y Lindberg, 2003).

La transmisión horizontal puede ser directa o indirecta. Se considera que el contacto directo de hocico - hocico entre un animal de la PI con un animal susceptible es la ruta más eficaz para la transmisión del agente. El contacto directo entre animales susceptibles y animales PI es una vía importante de transmisión de la infección para los primeros, en donde puede estar involucrada en la transmisión la inhalación o ingestión de saliva, descarga oculonasal, orina, heces, leche, secreciones uterinas, fluido amniótico, placenta y semen de animales infectados (Houe, 1999).

La transmisión vertical incluye la transmisión al feto a través de semen infectado y la transmisión de la vaca gestante persistentemente infectada (PI) a su feto. Esta es la forma como se generan los animales PI. El virus es eliminado en el semen tanto de machos PI y de los infectados agudamente, produciéndose en estos últimos, reversiblemente, una disminución del plasma seminal y un aumento del número de espermatozoides anormales. Cuando una hembra PI se reproduce, su descendencia siempre es PI, lo que puede dar lugar a la existencia de familias PI. Además, la transmisión puede ocurrir desde un animal con infección aguda, pero con mucha menos eficiencia que desde un animal PI. Estos terneros son una fuente mayor de propagación del virus, muy importante en la epidemiología de la enfermedad (Kovács *et al.*, 2003).

Las primeras poblaciones celulares que soportan la replicación viral son las células epiteliales de la cavidad bucal y del tracto digestivo, células linfoides, como consecuencia el animal puede presentar múltiples expresiones clínicas como: infección subclínica, infección

aguda por diarrea viral bovina, infección transplacentaria, infección persistente, enfermedad de las mucosas y diarrea viral bovina crónica (Rivera, 1993).

El virus ingresa a través de la vía oronasal, replicándose e inicialmente en las células epiteliales de la mucosa lingual, nasal, y en las tonsilas. De ahí se diseminan sistémicamente a través de linfocitos y macrófagos. La infección clínica aguda o Diarrea Viral Bovina es causada por VDVB2 desarrollando en un período de incubación de 5 a 7 días, seguido por una fiebre pasajera, leucopenia y viremia hasta 15 días. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por estomatitis erosiva aguda, diarrea, hemorragias, desórdenes respiratorios, elevado porcentaje de aborto y proporciones de mortalidad, anorexia y pérdida de peso (Dereget *et al.*, 2004).

La infección subclínica o inaparente es la de mayor prevalencia en la población bovina. Este tipo de infección se caracteriza por una ligera fiebre prolongada, leucopenia transitoria y rápida recuperación. El rol inmunosupresor del VDVB potencia o favorece el desarrollo de infecciones secundarias, sobretodo aquellas de tipo respiratorio como el complejo respiratorio bovino. El aspecto más relevante de la infección por el VDVB, ya sea en sus formas clínica y subclínica, es la infección de una vaca preñada. En ambos casos el virus es capaz de atravesar la placenta con un 100% de eficacia. El efecto del virus sobre el feto depende de la etapa de gestación y del biotipo del virus infectante (Baker, 1995).

Si una vaca susceptible es infectada con una cepa ncp durante el primer tercio de gestación (25 a 90 días o en algunos casos hasta 120 días), el feto desarrolla una inmunotolerancia y no reconoce al virus como extraño, si este ternero nace será inmunotolerante y persistentemente infectado (PI). Los animales con infección persistente constituyen los reservorios del virus y son de gran importancia en la epidemiología del virus. Las infecciones en otras etapas de la gestación pueden producir: reabsorción embrionaria, aborto, momificación, defectos o malformaciones congénitas, nacimiento de terneros débiles y pequeños y nacimiento de terneros normales (Kovács *et al.*, 2003). Estudios epidemiológicos sugieren que un 70% a 90% de bovinos adultos manifiestan este tipo de infección (Potgieter, 1995).

Un animal inmunocompetente infectado con el VDVB o vacunado responde mediante la formación de los anticuerpos neutralizantes indicando que el virus es un buen inmunógeno. Es

posible que un animal infectado desarrolle una respuesta inmune a la mayoría sino a todas las proteínas estructurales y no estructurales del virus. De las proteínas estructurales, la glicoproteína Gp 53 es inmunodominante y es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes. Aunque un animal infectado también desarrolla una potente respuesta por anticuerpos contra la p 80, no existe evidencia de que estos anticuerpos tengan la capacidad de neutralizar al virus (Collen y Morrison, 2000).

Existe evidencia de que el VDVB induce a respuesta con células B y células T, pero pocas informaciones están disponibles al respecto, sin embargo, para una adecuada inducción de la respuesta mediada por células se requiere del virus vivo, sugiriendo que las vacunas a virus vivo podrían ser importantes para controlar una infección primaria. Por otro lado, el virus y la vacuna a virus vivo modificado de DVB es un inmunodepresor y abortogénico, como inmunodepresor es un factor importante en el desarrollo del complejo respiratorio bovino (Bolin, 1995)

Sin embargo, un estudio realizado in vitro describe una respuesta virus-específico de las células T CD4⁺ y CD8⁺, en animales seropositivos. Los datos obtenidos en este estudio parecen reforzar el concepto de que la respuesta antiviral de las células T comprende células CD8⁺, capaces de actuar como efectoras contra células infectadas, y células CD4⁺, que pueden proporcionar ayuda para la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de limitar la diseminación del virus (Rhodes *et al.*, 1999).

Los linfocitos y los macrófagos constituyen células blanco importantes para la replicación viral. Debido a la afinidad que tiene el VDVB por las células inmunocompetentes, la infección del VDVB resulta en una disminución de algunas de estas células y, además, es dañada la función de las células sobrevivientes (Welsh, 1995)

Los neutrófilos de animales infectados tienen un marcado daño de la reacción de iodación, la cual es una medida de la actividad de los sistemas mieloperoxidasa y peróxido de hidrógeno. Asimismo, estas células experimenta reducción de la ingestión de *Staphylococcus aureus*, del citocromo C y del flujo de Ca citoplasmático. Debido a que estos sistemas son importantes en el mecanismo viricida, bactericida y fungicida de los neutrófilos, se pueden

explicar parcialmente la susceptibilidad incrementada de animales infectados con el VDVB a infecciones secundarias (Potgieter, 1995).

En el Perú, estudios serológicos han demostrado la presencia de VDVB en alpacas de una empresa asociativa de Puno (Rivera *et al.*, 1987 a), en una comunidad campesina del Cusco se reportó una prevalencia del 12% en alpacas, 74% en bovinos y 14% en ovinos (Alvarez *et al.*, 2001), en la provincia de Parinacochas se encontró 85.3% de prevalencia en bovinos (Rivera *et al.*, 2001). En una Comunidad de Arequipa se tuvo una prevalencia de 40% en ovinos y 14% en alpacas (Manchego *et al.*, 1998), pero no ha sido detectado en alpacas criadas bajo un buen sistema de manejo (Risco *et al.*, 1998).

No existen signos clínicos patognomónicos en las infecciones con el VDVB. Por lo tanto, el diagnóstico se basa en la detección de antígenos virales o de anticuerpos. En hatos positivos a la DVB, los animales persistentemente infectados pueden ser identificados por uso combinado de pruebas serológicas y virológicas. El conocimiento completo de las pruebas de diagnóstico en uso y de la epidemiología de la DVB es esencial para la identificación de animales virémicos en hatos infectados (Sandvick, 1999).

Las vacunas atenuadas tienen pocas partículas virales, las cuales se replican en el hospedero con gran eficacia estimulando una gran producción de anticuerpos neutralizantes, lo cual produce una respuesta de larga duración. Otras ventajas de estas vacunas son: confieren una rápida inmunización (entre 10 a 14 días postvacunación), requieren de una sola dosis, son baratas, y brindan protección contra una amplia gama de cepas víricas. Las desventajas de estas vacunas son: produce inmunosupresión, infección transplacentaria, enfermedad clínica en aquellos animales que se hallan en período de incubación (enfermedad de las mucosas), y potencian enfermedades secundarias. Además, el virus vacunal puede recombinarse originando un virus capaz de inducir enfermedad (Bolin, 1995).

Las vacunas inactivadas: son seguras, ya que no producen inmunosupresión, enfermedad postvacunal ni infecciones transplacentarias, sin embargo, estas vacunas son caras y requieren ser administradas en doble dosis en la primovacunación y deben ser reforzadas en períodos menores de 12 meses. Asimismo, la duración de la inmunidad inducida es corta y produce

escasa inmunidad frente a cepas heterólogas debido a que inducen una fuerte respuesta celular (Bolin, 1995).

A pesar de las grandes diferencias antigénicas entre VDVB1 y VDVB2, la inmunización del ganado con vacunas que emplean sólo VDVB1 proporciona inmunidad contra la enfermedad aguda causada por VDVB2. Recientes estudios realizados en bovinos en los cuales, se demostró que una inmunización usando una vacuna de VDVB1 atenuada, seguida por una vacuna de VDVB1 viva modificada confiere protección fetal completa contra un desafío con VDVB2. Así, es probable que las vacunas de VDVB más eficaces en el campo sean la combinación VDVB1 y VDVB2 (Dereget *et al.*, 2004).

Un buen programa de vacunación disminuye drásticamente la presentación de los casos. Lo ideal es utilizar vacunas polivalentes, que contienen los principales virus respiratorios, también se debe incluir en el cuadro básico de vacunación la bacterina contra *Pasteurella* (Radostits *et al.*, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A) MATERIAL:

1.- Animales y Muestras

El estudio fue realizado en 21 alpacas, 66 bovinos y 152 ovinos mayores de 6 meses de ambos sexos, criados en forma extensiva de tipo mixta con escasa tecnología y aparentemente sanos, pertenecientes a la comunidad de Chahuaytiri, que cuenta con una población de 244 alpacas, 2181 ovinos y 92 bovinos distrito de Pisac, provincia de Calca, departamento del Cusco ubicado a una altitud de 3,700 msnm. (INEI, 1995).

Los animales que se encontraron en libre pastoreo fueron llevados a corrales (cercos de piedra) para facilitar el manejo. Los animales seleccionados fueron identificados con aretes numerados y las muestras de sangre fueron colectadas individualmente, se separaron los sueros y fueron llevados para su procesamiento al laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). La toma de muestras se realizó en el mes de Julio del año 2003 (época seca).

2.- Equipos y Materiales

Se utilizó una congeladora de -20 C, cabina de flujo laminar Tipo II (Steril Gardhood, USA), estufa a 37°C de CO₂ (Mettler, Alemania), microscopio de luz simple invertido, Baño María (Precision Scientific, USA), centrífuga (Selecta), agitador de placa, microcentrífuga,

micropipetas simples y multicanales, frascos de cultivo descartables de 75 cm² y 25 cm², microplacas para cultivo celular con 96 pocillos, tubos al vacío (sistema vacutainers), agujas N. 20x 1 ½” y N. 18x1 ½” de doble salida, viales para la recolección del suero y pipetas pasteur.

3.- Reactivos y cultivos celulares

Como sistema indicador de la prueba de neutralización viral se utilizó cultivos primarios de células de cornete nasal de feto bovino (CNB) normal preparado en el Laboratorio de Virología de la FMV- UNMSM. Las células fueron cultivadas empleando medios de cultivo Eagle Minimal Esencial Médium (MEM) y Leibowitz (L-15), en una proporción 50:50 suplementadas con el 10% de suero fetal bovino libre de VDVB (SIGMA, USA).

4.- Cepas del VDVB, VPI-3 Y VRS

Las Cepas de los virus utilizados fueron la cepa Singer del virus de la Diarrea Viral Bovina, la cepa SF-4 del virus de la Parainfluenza bovino 3 y la cepa Mohanty del virus Respiratorio Sincitial procedentes de USA, sueros positivo y negativo de referencia.

B) METODOS:

1.- Colección y procesamiento de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción directa de la vena yugular utilizando el sistema vacutainer y agujas 20x1 ½” y 18x1 ½”, identificadas y transportadas al Laboratorio de la Estación Experimental del IVITA-Maranganí, para la obtención de los sueros mediante centrifugación a 2000 RPM por 5 minutos, luego fueron transferidas a viales y conservadas en congelación a -20° C hasta su utilización en la prueba de neutralización viral en el laboratorio de Virología de la FMV-UNMSM.

2.- Tamaño Muestral

La técnica de selección de muestra se realizó mediante el método no paramétrico de muestreo al azar simple. Se tomó como referencia la prevalencia del 13.3% en el caso de ovinos, 73% en bovinos (Álvarez *et al.*, 2001) y 8% en alpacas (Manchego *et al.*, 1998) con un nivel de confianza del 95% y un error de 5%. El número de muestras se determinó usando la fórmula de proporciones en poblaciones finitas (Daniel, 1996).

$$n = \frac{N z^2 p q}{e^2 (N-1) + z^2 pq}$$

Donde:

n = tamaño de muestra mínimo.

z = Nivel de confianza (95%).

p = prevalencia de referencia.

q = 1-p.

e = Precisión (5%).

Aplicando la fórmula se determinó que el tamaño muestral mínimo que se requirió para el presente estudio fue de 161 ovinos, 77 alpacas y 70 bovinos. Sin embargo, no fue posible completar este tamaño de muestra, obteniéndose sólo muestras de 152 ovinos, 66 bovinos y 21 alpacas, debido a la dificultad de tipo geográfico y falta de colaboración por algunos criadores que no permitieron la toma de muestra de sus animales. Por otro lado, gran parte de alpacas se encontraban temporalmente aprovechando pastos estacionales en zonas ubicadas sobre los 4,500 msnm, debido a la época seca en que fue realizado el muestreo.

3.- Detección de anticuerpos neutralizantes

Las muestras fueron conservadas en congelación a -20° C hasta la fecha de su utilización. La detección y cuantificación de los anticuerpos contra los virus de la DVB, PI-3 y RS se realizó mediante la prueba serológica de neutralización viral, en placas descartables de 96 hoyos, según la técnica descrita por la OIE (1996) que se encuentra disponible en el Laboratorio de Virología de la FMV-UNMSM.

Descripción de la prueba de neutralización viral (NV)

Esta prueba fue realizada de la siguiente manera:

- Los sueros fueron inactivados a 56° C por 30 minutos en Baño María.
- Se colocó 50 µl de diluyente (MEM+ antibiótico) en una microplaca de 96 hoyos para cultivo celular.
- Se añadió 50µl de suero en la primera hilera de la microplaca (12 sueros diferentes).
- Con una micropipeta multicanal se realizó diluciones dobles, empezando por 1:2 hasta 1:256, eliminándose de esta última hilera 50µl de la mezcla suero- diluyente.
- Se añadió a toda la microplaca 50µl de (VDVB, VPI-3 y VRS) según sea el caso conteniendo 100 DI50 CC /50µl.
- En otra placa se realizó los controles de 100, 10 y 1 dosis infectivas del virus y de las células CNB utilizadas.
- Se incubó, incluyendo la placa control, en estufa a 37° C por una hora.
- Cumplido este tiempo se añadió a toda la microplaca incluido los controles, 100µl de una suspensión de células de CNB (3×10^3 / hoyo) y se incubó en estufa a 37° C y 5% de CO₂ por 4 días luego del cual se hizo la lectura.

Lectura

El título del suero fue la dilución más alta capaz de neutralizar las 100 DI₅₀CC/50µl del virus, evidenciado por la ausencia del efecto citopático de los virus sobre las células

indicadoras (empezando de la dilución menor a la dilución mayor). Títulos del suero iguales o mayores a 1:2 fueron considerados positivos a anticuerpos contra los virus descritos.

4.- Análisis de Datos:

La seroprevalencia fue determinada por la siguiente fórmula (Thursfield, 1990)

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{\text{Número de muestras positivas} \times 100}{\text{Total de muestras}}$$

La prevalencia es expresada con intervalos de confianza (IC) de 95% según la siguiente fórmula:

$$P \pm Z \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

En donde:

p = prevalencia.

Z = 95% del nivel de confianza.

q = 1- P.

n = tamaño muestral.

I V. RESULTADOS

La prevalencia de los virus DVB, PI3 y RS en rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri se presenta en el **Cuadro 1**.

En los **Cuadros 2, 3 y 4** se presentan los títulos de anticuerpos detectados contra los virus en estudio y las especies animales. El mayor porcentaje de títulos obtenidos variaron entre 1:16 a 1: 64 en las tres especies estudiadas.

Cuadro 1. Seroprevalencia de los virus: Diarrea Viral Bovina, Respiratorio Sincitial y Parainfluenza 3 en rumiantes de crianza mixta, de la comunidad de Chahuaytiri mediante la prueba de neutralización viral. 2003

Especie	Nº Animales	VDVB			VRS			VPI-3		
		Nº	%	I.C	Nº	%	I.C	Nº	%	I.C
Bovinos	66	60	90.9 ± 6.9		58	87.88 ± 7.9		54	81.8 ± 9.3	
Ovinos	152	43	28.29 ± 7.1		75	49.34 ± 7.9		76	50.0 ± 7.9	
Alpacas	21	3	15.79 ± 16.4		1	4.76 ± 9.1		5	23.81 ± 18.2	

Cuadro 2. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina en muestras de suero de rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri, mediante la prueba de neutralización viral. 2003

Títulos de anticuerpos contra el VDVB *			
Especie	2-8	16-64	128-≥256
Bovinos	9	39	12
Ovinos	3	33	7
Alpacas	2	1	0

* = Título expresado como inversa de la dilución

Cuadro 3. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el Virus Respiratorio Sincitial en muestras de suero de rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri, mediante la prueba de neutralización viral. 2003

Especie	Títulos de anticuerpos contra el VRS*		
	2 - 8	16 - 64	128 - ≥ 256
Bovinos	4	37	18
Ovinos	12	54	9
Alpacas	0	1	0

* = Título expresado como inversa de la dilución

Cuadro 4. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el virus Parainfluenza 3 en muestras de suero de rumiantes de la comunidad de Chahuaytiri, mediante la prueba de neutralización viral. 2003.

Especie	Títulos de anticuerpos contra el VPI-3*		
	2 - 8	16 - 64	128 - ≥ 256
Bovinos	8	41	5
Ovinos	15	48	13
Alpacas	1	4	0

* = Título expresado como inversa de la dilución

V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran la presencia de los virus de la DVB (VDVB), RS (VRS) Y PI3 (VPI3) en bovinos, ovinos y alpacas de la Comunidad de Chahuaytiri. Los anticuerpos neutralizantes detectados indican que los animales fueron expuestos a infecciones naturales con los tres virus en estudio y es una evidencia de la circulación de estos agentes virales en los rumiantes de esta comunidad. Estos virus tuvieron mayor prevalencia en los bovinos luego en los ovinos y alpacas (Cuadro 1).

A pesar de que el rebaño mixto de la comunidad es sometido al mismo tipo de manejo, es notoria la alta prevalencia (90.90%) del VDVB, en los bovinos (Cuadro 1). Esta diferencia respecto a lo encontrado en los ovinos y alpacas podría deberse al tamaño de la población frente al ovino, o a una mayor susceptibilidad del bovino a las cepas del VDVB que circula en el área. Sin duda, el VDVB fue introducido al rebaño de la comunidad a través del bovino y posiblemente se mantiene en la población constituyendo fuente de infección para las otras especies. Alvarez *et al* (2001), también detectaron una mayor prevalencia del VDVB en bovinos de una comunidad de canchas en el Cusco a pesar de la crianza mixta con ovinos y alpacas. Así mismo, en un estudio realizado en bovinos criollos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho, se detectó una prevalencia del VDVB superior al 70% (H. Rivera, comunicación personal). Estos resultados evidencian que el VDVB está ampliamente difundido en el ganado bovino criollo de las zonas altoandinas y valles interandinos y su rol podría ser el de un agente primario en la ocurrencia de problemas respiratorios, infertilidad, etc. pero podría estar siendo confundido con otros problemas como la desnutrición, parasitosis, etc.

Si bien la población de las alpacas muestreadas de la comunidad fue reducida, el resultado de 15.79% (3/21) de reactores al VDVB es similar a lo reportado en alpacas en previos estudios realizados en otras comunidades (Rivera *et al.*, 1987; Manchego *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 2001). La detección de anticuerpos contra el pestivirus bovino en las alpacas y camélidos en general, demuestra que esta especie es susceptible al virus pero parecería que el mecanismo de la infección en esta especie difiere de los otros rumiantes ya que normalmente cuando el VDVB ingresa a un hato o rebaño bovino susceptible, se difunde rápidamente en la población, los animales forman anticuerpos que perduran en niveles detectables por largo período (Fredriksen *et al.*, 1999 c), este mecanismo al parecer no ocurre en las alpacas porque la prevalencia del virus es bajo comparado al bovino del mismo rebaño. Es posible que el medio ambiente y el sistema de manejo juegan un rol importante en esta aparente resistencia de la alpaca en el Perú, ya que en otros ecosistemas como Canadá, USA, se han reportado la infección con el VDVB y el desarrollo de signos clínicos como el aborto y nacimiento de crías portadoras del virus (Carman *et al.*, 2005).

Un argumento más sobre la posible diferencia en la dinámica de infección del pestivirus en bovinos y alpacas en el rebaño mixto estudiado son los niveles de anticuerpos contra el VDVB, mientras que en las alpacas solo uno tuvo un título de 1:16, en los bovinos 12 animales tuvieron títulos entre 1: 128 a > 1: 256 (Cuadro 2) los cuales en animales no vacunados son considerados títulos altos y significan un continuo desafío de estos animales con el virus (Luzzago *et al.*, 1999) indicando que los bovinos son la fuente principal de infección para las otras especies.

El 28.29% (43/ 152) de los ovinos resultaron seroreactores a DVB empleando antígeno del VDVB debido a su relación antigénica con el virus de la enfermedad de la frontera. Esta prevalencia es menor a lo reportado por Manchego *et al* (1998) y Alvarez *et al* (2001) sugiriendo que la infección en la especie ovina varía entre las comunidades probablemente de acuerdo al número de la población, grado de infección en el rebaño y otros factores.

Los VRS y VPI3 estuvieron también difundidos en el rebaño mixto de la comunidad siendo igualmente los bovinos en los que ambos agentes tuvieron mayor prevalencia (Cuadro 1). La actividad viral fue evidenciado por los títulos de anticuerpos entre 1:16 a mayores a 1: 256 en

la mayoría de los bovinos y ovinos (Cuadros 3 y 4). Los altos títulos de anticuerpos contra el VRS y VPI3 en bovinos y ovinos fueron estadísticamente significativos con respecto a las alpacas, sugiriendo una susceptibilidad incrementada de los rumiantes europeos a ambos agentes virales y que serían fuentes de infección para el resto de animales del rebaño.

Recientes estudios realizados en alpacas de 31 rebaños de la provincia de Canchis, Cusco, el 80.2% y 67.5% de las alpacas adultas tuvieron anticuerpos contra el VRS y VPI3 respectivamente (Victorio *et al.*, 2004) sugiriendo que si bien ambos virus respiratorios están difundidos en los rebaños mixtos, existen diferencias con respecto a las alpacas de la comunidad de Chahuaytiri. Los virus RS y PI3 tienen especial tropismo por el tejido respiratorio y son ampliamente difundidos en los rumiantes europeos afectando principalmente a los animales jóvenes (Kahrs, 1981; Poel *et al.*, 1994). Según referencias de los comuneros los problemas más frecuentes en su rebaño fueron la mortalidad de los animales jóvenes por problemas respiratorios; usualmente estos problemas son exacerbados por el intenso frío y la falta de pastos los que propiciarían la infección por estos virus que en asociación con los parásitos pulmonares ocasionarían la muerte de los animales. Otro aspecto que podría favorecer la difusión de los virus considerados en el estudio es el movimiento de animales que existe en la comunidades campesinas, dependiendo de la facilidad del acceso durante la época de empadre o ferias comunales en donde alpacas, bovinos y ovinos de diversos estados sanitarios son confinados.

VI. CONCLUSIONES

Los virus de la Diarrea Viral Bovina, Respiratorio Sincitial y Parainfluenza 3 están presentes en el rebaño mixto (bovinos, ovinos y alpacas) de la comunidad de Chahuaytiri, provincia de Calca, Cusco. Estos tres agentes virales estuvieron más difundidos en la especie bovina de ésta comunidad.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Adair, B.; H. Bradford; M. McNulty; J. Foster. 1999. Cytotoxic interactions between bovine Parainfluenza type 3 virus and bovine alveolar macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 67: 285-294.
2. Alvarez, S.; H. Rivera; D. Pezo; R. Rosadio. 2001. Diarrea viral Bovina en Rumiantes de una comunidad campesina de la Provincia de Canchis, Cusco. *Rev Inv Vet (Perú)*. Suplemento 1: 382 – 384.
3. Ameghino, E. 1990. Neumonías. Avances sobre investigación en Salud Animal Camélidos Sudamericanos. IVITA- Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Bol. Div. 23: 25-31.
4. Ameghino, E.; J. De Martini. 1991 a. Mortalidad en Crías de Alpacas. Impresión Martegraf. Lima - Perú Pág. 71.
5. Aquino, H. 1997. El Rebaño Mixto Familiar en Comunidades Pastorales de la Sierra Sur del Perú. Guía pecuaria del centro de capacitación agroindustrial “Jesús Obrero”- CCAIJO - Cuzco. Pág. 116.
6. Baker, J. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am food Animal Pract.* 11(3): 425-445
7. Baule, C.; K. Kulcsar; K. Belak; M. Albert; C. Mittelholzer; L. Kucsera; S. Belak. 2001. Pathogenesis of Primary Respiratory Disease Induced by isolates from A New

Genetic Cluster of Bovine Viral Diarrhoea Virus Type I. *Journal of Clinical Microbiology* 39(1): 146-153.

8. Barriga, E. 1997. Tesis “Incidencia de IBR y BVD en establos proveedores de leche a Gloria S.A. en las irrigaciones de Majes, Santa Rita de Sigüas, La Joya Antigua y los distritos de Sachaca y Cerro Colorado”. Tesis Bach Fac Med Vet Univ Católica de Santa María. 1-67.
9. Bolin, S. 1995. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North Am. Food Animal Pract.* 11(3): 615-625.
10. Brako, E.; R. Fulton; S. Nicholson; G. Ambrorski. 1982. Prevalence of bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhoea, Parainfluenza 3, goat respiratory syncytial, bovine leukemia, and bluetongue viral antibodies in sheep. *Am J Vet Res.* 45 (4): 813-816.
11. Brownlie, J.; L. Hooper; I. Thompson; M. Collins. 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) – the bovine pestivirus. *Clinical and Diagnostic. Virology* 10: 141-150.
12. Bryson, G., M. Platten; S. McConnell; M. McNulty. 1991. Ultrastructural Features of Lesions in Bronchiolar Epithelium in Induced Respiratory Syncytial Virus Pneumonia of Calves. *Veterinary Pathology. Northern Ireland, Reino Unido.* 28:293-299.
13. Carman, S., N. Carr; J. DeLay; M. Baxi; D. Dereget; M. Hazlett. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest* 17: 589-593.
14. Collen, T.; W. Morrison. 2000. CD4 (+) T-Cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res.* 67: 67-80.

15. Collins, M.; M. Desport; J. Brownlie. 1999. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology* 259: 85-98.
16. Daniel, W.; 1996. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. 3ra. Limusa S.A. México. Pág 202-209.
17. Dereget, D.; R. Jacobs; P. Carman; S. Tessaro. 2004. Attenuation of a virulent type 2 bovine viral diarrhea virus. *J Veterinary Microbiology*. 100: 151-161.
18. Fredriksen B.; T. Sandvik; T. Loken; S. Odegaard. 1999 c. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record*. 114: 111-114.
19. Fulton, R.; D. Step; J. Ridpath; A. Confer; J. Saliki; B. Johnson; R. Briggs; R. Hawley; L. Burge; M. Payton. 2003. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and *Mannheimia haemolytica* bacterin- toxoid. *J Vaccine* 21: 2980-2985.
20. Graham, B. 1996. Immunological determinants of disease caused by Respiratory Syncytial Virus. *J Trend in Microbiology virulence, infection and pathogenesis*. (4): 290-294.
21. Haller, A.; T. Miller; M. Mitiku; K. Coelingh. 2000. Expression of the surface Glycoproteins of human Parainfluenza Virus Type 3 by Bovine Parainfluenza Virus Type3, a novel attenuated virus vaccine vector. *Journal of Virology*. 74 (24): 1626-1635.
22. Haller, A.; M. MacPhail; M. Mitiku; R. Tang. 2001. A single amino acid substitution in the viral polymerase creates a temperature-sensitive and attenuated recombinant Bovine Parainfluenza Virus Type 3. *J Virology* 288: 342-350.

23. Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.* 64: 89- 107.
24. Hurk, S.; R. Braun; B. Karvonen. 1999. Immune Responses and Protection Induced by DNA Vaccines Encoding Bovine Parainfluenza Virus Type 3 Glycoproteins1. *Veterinary infectious disease organization. J Virology.* 260: 36-46.
25. INEI. Instituto Nacional de Estadística e Informática. 1995. III Censo Nacional Agropecuario: Resultados Definitivos, Departamento de Cuzco. Lima - Perú Tomo II. Pág. 152 – 203.
26. Kahrs, R. 1981. *Viral Diseases of Cattle.* Iowa State University Press. Pág 215-219.
27. Kimberling, C.V. 1988. *Jensen and swift's Diseases of sheep.* 3ra Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. Pág. 179-181.
28. Kovács, F.; T. Magyar; C. Rinehart; K. Elbers; K. Schlesinger; W. Ohnesorge. 2003. The live attenuated bovine viral diarrhea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *J Veterinary Microbiology* 96: 117-131.
29. Lamontagne, L.; J. Descoteaux; R. Roy. 1985. Epizootiological survey of Parainfluenza 3, Reovirus 3, Respiratory syncytial and Infectious bovine rhinotracheitis viral antibodies in sheep and goat flocks in Québec. *Can J Comp Med.* 49: 424 - 428.
30. Lehmkuhl, H.D.; R. C. Cutlip; S.R. Bolin; K.A. Brodgen. 1985. Seroepidemiologic survey for antibodies to selected viruses in the respiratory tract of lambs. *Am. J Vet Res.* 45: 1924 - 1927.
31. Luzzago, C.; R. Piccinini; A. Zepponi; A. Zecconi. 1999. Study on prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in 29 Italian dairy herds with reproductive problems. *Vet. Microbiol.* 64: 247-252.

32. Manchego, A.; H. Rivera; R. Rosadio. 1998. Seroprevalencia de Agentes virales en Rebaño mixto de una comunidad andina peruana. *Rev Inv Pec IVITA (Perú)*. 9(2) : 1 – 10
33. Mansilla, E. 2004. Producción, procesamiento y comercialización de la fibra de alpaca, una propuesta para el Cusco. Pág 71. En: Camélidos sudamericanos. Bases para un programa Macro regional de ciencia, tecnología e innovación. CONCYTEC-CONACS. Perú.
34. Martin, W.B.; I.D. Aitken. 1983. *Diseases of Sheep*. 3ra Ed. Blackwell Science. London. Pág 177-179.
35. Mattson, D. 1994. Update on llama medicine. *Viral Disease. Vet. Clín. North. Am. Food Anim. Pract.* 10:345-351.
36. Niskanen, R.; A. Lindberg. 2003. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Unhygienic vaccination procedures, Ambient Air, and from contaminated pens. *The veterinary journal*.165:125-130.
37. Nobiron I.; I. Thompson; J. Brownlie; M. Collins. 2003. DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *J Vaccine*. 21: 2082-2092.
38. Novoa, C.; Flores, A. 1991. Producción de ruminantes menores: Alpaca. 1ª Ed. Programa de apoyo a la Investigación colaborativa en rumiantes menores (SR-CRSP). (Perú). Pág 6-15
39. Office International des Epizooties (OIE). 1996. World organization for animal health. Bovine Viral Diarrhoea in : *Manual of standards diagnostic tests and vaccines*. 651-658.
40. Olsen, R.; S. Krakowka; J. Blakeslee. 1984. Comparative Pathobiology of Viral diseases. Florida. (2): 111.

41. Poel, WHM Van der.; J.A. Kramps; W.G. Middel; J.T. Van Oirschot; A. Brand. 1993. Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Arch Virol.*133 (3-4): 309.
42. Poel, WHM Van der.; A. Brand; J.A. Kramps; J.T. Oirschot. 1994. Respiratory syncytial virus infections in human beings and cattle, an epidemiological review. *J Infection.* 29(2): 215-228.
43. Poel, WHM Van der.; J.P. Langedijk; J.A. Kramps; W.G. Middel; A. Brand; J.T. Van Oirschot.1995. Bovine respiratory syncytial virus antibodies in non-bovine species. *Arch Virol.* 140(9):1549-1555.
44. Potgieter, L.N. 1995. Immunology of Bovine Viral Diarrhea. *Vet Clin North. Am Food Anim Pract.* 11(3): 501-520.
45. Radostits, O.; C. Gay; D. Blood; K. Hinchcliff. 2002. *Medicina Veterinaria.* 9na. Ed. Interamericana- Mc Graw- Hill, (España). Pág: 1375-1404.
46. Risco, V.; H. Rivera; D. Peso; W. García; R. Rosadio. 1998. Detección de anticuerpos y virus de la DVB en alpacas durante una campaña reproductiva. *Rev. Inv. Pec. IVITA (Perú) (Nº Extraordinario)* 9 (2): 59-64.
47. Rivera, H.; B.R. Madewell; E. Ameghino. 1987 a. Serological Survey of viral Antibodies in Peruvian Alpaca (*Lama pacos*). *Am J Vet Res.* 48 (2): 181-191.
48. Rivera, H.; H. Andresen; J. Levano. 1987 b. Prevalencia de Anticuerpos a Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (PI-3) y Enfermedad Respiratoria Sincitial (RSV) en bovinos de Lima. *Libro Resúmenes: IX Congreso de Ciencias Veterinarias. Cajamarca - Perú.* Pág 18.

49. Rivera, H.; B. Madewell; E. Ameghino. 1990 a. Estudio serológico de anticuerpos virales en llamas. IVITA- UNMSM. Bol. Div. N° 23: 58-59.
50. Rivera, H.; Ameghino, E. 1990. Estudio serológico de anticuerpos virales en Vicuñas. IVITA- UNMSM. Bol. Div. 23: 60-61.
51. Rivera, H. 1993. El virus de la diarrea viral bovina (BVD). Rev Inv Pec IVITA-UNMSM. 6(1): 1-7.
52. Rivera, H.; A. Manchego; N. Sandoval; C. Morales; E. Flores. 1994. Complejo Respiratorio bovino en terneros del valle de Lima. Rev Inv Pec IVITA-UNMSM. (Perú). 7: 35 – 38.
53. Rivera, H.; A. Benito; J. Chacón. 2001. Distribución del virus de la diarrea viral bovina en tejidos de un bovino persistentemente infectado. Rev. Inv. Vet. Perú. Suplemento 1: 393-395.
54. Rivera, H.; L. Valdivia; A. Benito. 2001. Diarrea Viral Bovina en bovinos lecheros de crianza semiintensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. Rev. Inv. Vet. Perú. Suplemento 1: 380-381.
55. Rhodes, S.; J.M. Cocksedge; R.A. Collins; W.I. Morrison. 1999. Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. Journal of General Virol. 80:1673-1679.
56. Rosadio, R.; E. Ameghino. Enfermedades de los ovinos en el Perú. 1999. FMV-UNMSM. Pub. Téc. N 40.
57. Rosadio, R.; T. Evermann; J. DeMartín. 1984. A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. Vet. Microbiology. 10: 91-96.

58. Sandvik, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for Bovine Viral Diarrhoea Virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 64: 123- 134.

59. Sanjuán, M. L.; C. García; J.C. Corrales. 1999. Etiopatogenia de la diarrea vírica bovina: aspectos de interés. En: E. Yus y M.L. Sanjuán. Eds. *Diarrea Vírica Bovina*. Consejo General de Médicos Veterinarios de España. 24: 9-24.

60. Schrijver, R.; J. Langedijk; W. Van der Poel; W. Middel; J. Kramps; J. Van Oirschot. 1996. Antibody responses against the G and F proteins of Bovine Respiratory Syncytial Virus after experimental and natural infections. *American Society for Microbiology.* 5(3): 500-506.

61. Thursfield, M. 1990. *Epidemiología Veterinaria*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España. Pág: 223-230.

62. Tjornehoj, K.; A. Uttenthal; L. Larsen; C. Rontved; L. Ronsholt. 2002. An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves. *Veterinary Science.* 74: 55 - 65.

63. Trejo, W. 2004. Ciencia, tecnología e innovación en camélidos sudamericanos. Pág 10. En *Camélidos sudamericanos, Bases para un Programa Macro Regional de Ciencia Tecnología e Innovación*. PROALPACA. CONCYTEC, Lima- Perú.

64. Valarcher, J.; F. Schelcher; H. Bourhy. 2000. Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology.* 74 (22): 10714 -10728.

65. Valarcher, J.; H. Bourhy; A. Lavenue; N. Bourges-Abella; M. Roth; O. Andreoletti; P. Ave; F. Schelcher. 2001. Persistent infection of B lymphocytes by Bovine Respiratory Syncytial Virus. *J Vet Virology* 291:55-67.

66. Valentova, V. 2003. The Antigenic and genetic variability of bovine respiratory syncytial Virus UIT emphasis on the G protein. *Vet. Med.- Czech.* 48 (9): 254-266.

67. Van Drunen, S.; R. Braun; B. Karvonen; T. King; D. Yoo; L. Babiuk. 1999. Immune responses and protection induced by DNA. Vaccines encoding Bovine Parainfluenza Virus Type 3 Glycoproteins. *J Vet Virology* 260: 35 - 46.
68. Victorio, W.; R. Rosadio; H. Rivera; A. Manchego. 2004. Seroprevalencia de los Virus Neumopatógenos de la Parainfluenza Bovina 3 (VPI 3), Herpesvirus Bovino 1 (HVB1) y Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) en alpacas adultas de la provincia de Canchis–Cusco. *Rev Inv Vet (Perú)*. 15(2): 127-131.
69. Whelsh, M.; B. Adair; J. Foster. 1995. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *J Vet Immunology and Immunopathology*. 46:195-210.
70. Zanabria, V.; H. Rivera; R. Rosadio. 2000. Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. *Rev Inv Vet. Perú* . 11 (2): 67 – 85.